

北五味子对糖尿病脑病大鼠脑中神经活性物质含量影响的在线微透析-高效液相色谱-串联质谱联用分析

皮子凤¹, 王倩倩¹, 张 静², 宋凤瑞¹, 刘志强¹

(1. 中国科学院长春应用化学研究所国家质谱中心(长春), 吉林省中药化学与质谱重点实验室, 长春 130022;
2. 吉林大学药学院, 长春 130021)

摘要 采用在线微透析-高效液相色谱-串联质谱联用方法, 测定了糖尿病脑病大鼠大脑海马区的 8 种神经递质的含量, 从脑中神经活性物质的角度研究五味子改善学习记忆能力的作用机制. 实验结果表明, 经五味子治疗后, 痴呆大鼠脑透析液中的谷氨酸(Glu)、丝氨酸(Ser)、多巴胺(DA)及 5-羟色胺(5-HT)的含量显著降低($P < 0.05$), 牛磺酸(Tau)及乙酰胆碱(Ach)的含量显著升高($P < 0.01$), 天冬氨酸(Asp)和 γ -氨基丁酸(GABA)的含量有降低趋势($P > 0.05$), 8 种神经活性物质的水平均向正常水平发生了调节. 此结果说明五味子可能通过调节糖尿病大鼠脑中神经活性物质的含量发挥保护中枢神经系统的作用, 从而改善糖尿病脑病大鼠的学习记忆能力. Morris 水迷宫实验结果表明, 五味子水提取物可以明显缩短糖尿病脑病大鼠的逃避潜伏期, 增加穿越目标区域次数及中心区域(%) ($P < 0.05$).

关键词 五味子; 在线微透析-高效液相色谱-串联质谱联用; 糖尿病脑病大鼠; 海马区; 神经活性物质
中图分类号 O656 **文献标志码** A

五味子(Schisandra fruit)是我国传统中药, 包括北五味子[Schisandra chinensis(Turcz) Baill]和南五味子(Schisandra Sphenanthera), 以北五味子为上品. 传统中医认为该药具有收敛固涩、益气生津及补肾宁心等多种功效^[1]. 研究表明, 五味子的药理作用涉及中枢神经系统、心血管系统、消化系统、生殖系统以及泌尿系统等多个方面^[2~4]. 五味子中主要成分对中枢神经系统具有改善学习记忆、镇静、催眠、抗衰老和镇痛等作用. 文献^[5]报道五味子总木脂素可延长记忆障碍模型小鼠在有效区和平台区的停留时间, 其机制可能与细胞水平调节 Bcl-2 家族蛋白的表达而有效降低脂质过氧化产物水平, 或抑制 NF- κ B 的核转录、抑制海马区 Caspase-3 蛋白的表达等多种途径有关^[6]. 五味子水提液能恢复 D-半乳糖所致损伤的乳鼠大脑培养神经的超微结构, 对 D-半乳糖所致衰老神经细胞有保护作用^[7]. 此外, 五味子醇甲可提高 PC12 细胞的存活率并降低其细胞上清液中 NO 的浓度, 可增加 Bcl-2 蛋白的表达量, 高剂量组五味子醇甲可降低 bax 蛋白表达量^[8].

微透析技术是一种利用膜透析原理, 在不破坏(或很少破坏)生物体内环境的前提下, 对生物体细胞间液内源性或外源性物质进行连续采样的新技术. 它具有原位取样、组织损伤少和无需样品预处理等优点. 在线微透析是一种微量和动态的连续采样方法, 已被广泛应用于活体分析、过程监测及药物与蛋白相互作用等方面的研究^[9~12]. 如常理文等^[10]采用反相液相色谱分离-脉冲安培检测和微透析取样技术, 测定了取自鼠脑尾核和海马区微透析液中儿茶酚胺类神经递质的含量, 并对不同神经活动状态下所得微透析液中肾上腺素含量进行了比较. 利用质谱进行定量分析, 具有灵敏、快速及特异性强的优点, 适合生物样本的分析^[13,14]. 此外, 由于高效液相色谱在样品运行中对管路压力的要求较高, 文献^[15~17]报道的微透析与 LC-MS 的联用也大多采用离线的方式进行. 本课题组^[18]通过自行研发

收稿日期: 2014-09-09. 网络出版日期: 2015-01-30.

基金项目: 国家自然科学基金(批准号: 81373952)和国家科技部创新方法工作专项(批准号: 2012IM030600)资助.

联系人简介: 刘志强, 男, 博士, 研究员, 博士生导师, 主要从事天然药物化学与有机质谱学研究. E-mail: liuzq@ciac.ac.cn

的耐高压自动进样器实现了微透析与 HPLC-MS 或 UPLC-MS 的在线联用,并将微透析-高效液相色谱-质谱联用方法用于研究人参对糖尿病大鼠脑递质含量的影响。

目前,对五味子提高动物学习记忆能力的作用机制主要从生化及分子生物学角度进行研究,本文则采用在线微透析-高效液相色谱-质谱联用技术,从大脑神经活性物质角度探讨了五味子改善学习记忆能力的作用机制。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

微透析系统包括微透析泵(CMA402)、灌注器(CMA1.0 mL)、清醒动物活动装置(CMA120)、MAB6 脑探针、ASI 脑定位仪和颅钻; ACQUITY™ 超高效液相色谱和 Xevo TQ 质谱仪(美国 Waters 公司); Venusil ASB C₁₈ 液相色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm, 天津 Agela Technologies); WMT-100 水迷宫系统(成都泰盟科技有限公司); 自组装耐高压在线进样器。

链脲佐菌素(STZ)、谷氨酸(Glu)、天冬氨酸(Asp)、牛磺酸(Tau)、丝氨酸(Ser)、γ-氨基丁酸(GABA)、5-羟色胺(5-HT)、多巴胺(DA)和乙酰胆碱(Ach)对照品(Sigma-Aldrich 公司); 甲醇(HPLC 级, Fisher 公司); 甲酸(HPLC 级, Tedia 公司); Milli-Q 超纯水制备系统(Millipore 公司)。

人工脑脊液(aCSF)由 1.2 mmol/L CaCl₂, 2.0 mmol/L Na₂HPO₄·12H₂O, 1.0 mmol/L MgCl₂, 2.7 mmol/L KCl 和 145 mmol/L NaCl 配制, pH=7.4。北五味子购于北京同仁堂药店,经长春中医药大学王淑敏教授鉴定。北五味子水提物的制备:将北五味子粉碎后称取适量,加 10 倍体积水浸泡 20 min,加热回流提取 2 次,每次 45 min,合并提取液,浓缩后冻干,置于阴凉干燥处储存,备用。

1.2 动物实验

Wistar 大鼠 30 只(雄性,体重 180~200 g),适应性喂养 7 d 后,对其中 20 只进行糖尿病造模,另 10 只作为正常对照组。

糖尿病大鼠造模:将雄性大鼠用高脂高糖饲料(18%猪油+20%蔗糖+3%蛋黄+59%基础饲料)饲养 56 d。按体重腹腔注射(35 mg/kg)新鲜配制的链脲佐菌素(STZ)溶液(0.1%柠檬酸缓冲液, pH=4.5),7 d 后,尾部采血测定血糖浓度大于 16.7 mmol/L 即为成功的糖尿病模型大鼠。正常对照组喂大鼠标准饲料。造模成功后,五味子组(Schisandra group)按照 2 g/kg 剂量给药,模型组(model group)和正常对照组(control group)灌胃给予等量蒸馏水。给药第 10 周,参照文献[19]进行水迷宫实验,定位航行实验以逃避潜伏期(ELT)为考察指标;空间探索实验监测大鼠 120 s 内穿越有效区域次数及原平台所在象限路程/总路程[中心区域(%), central zone(%)]。

水迷宫实验方法:实验前一天,将大鼠面朝池壁放入水中游泳 120 s 后除湿放回笼中,进行适应性实验。(1) 定位航行实验:在迷宫(直径 120 cm,高 50 cm)内注入一定量水,水温控制在(24±2)℃。选取 4 个入水点,并将迷宫等分为 4 个象限。在其中任一象限正中放置透明塑料平台(直径 10 cm),没于水下 2 cm,并在实验过程中保持其位置不变。水中加入脱脂奶粉使大鼠不能见到平台。将大鼠分别从各象限入水点面朝池壁顺次放入水中,记录其在 120 s 内寻找并爬上平台的时间,即为逃避潜伏期,爬上平台后允许大鼠停留 20 s,间隔 60 s 后进行下一次测试。如果大鼠在 120 s 内未能找到平台,则将其引上平台并停留 20 s,记录其潜伏期为 120 s。实验连续进行 5 d。(2) 空间探索实验:定位航行实验结束 24 h 后取出平台,在原平台所在象限的相对象限入水点将大鼠放入水中,监测其 120 s 内穿越有效区域的次数(time of crossing target zone)及原平台所在象限路程/总路程。

微透析采样:在大鼠海马区(A: -5.6 mm, L: -4.6 mm, V: -4.6 mm)^[20]埋入脑探针套管,恢复 2 天后,在动物清醒状态下插入脑探针,以 1.0 μL/min 流速灌流 aCSF,平衡 2 h,给药 1 h 后开始在线检测,每 20 min 进样一次,每只大鼠监测 3 h。

1.3 色谱及质谱条件

色谱条件:柱温为室温;流速 0.5 mL/min;流动相 A 为含 0.12%(体积分数)甲酸的水溶液;流动相 B 为含 0.06%(体积分数)甲酸的 33%(体积分数)的甲醇水溶液;梯度洗脱:0~3.5 min, 0%B; 3.5

~4 min, 0~22%B; 4~8 min, 22%~24%B; 8~8.5 min, 24%~100%B; 8.5~15.5 min, 100%B; 15.5~16 min, 100%~0; 进样量 20 μ L. 0~3.5 min 流出物切换至废液, 不进入质谱检测.

质谱条件: ESI 正离子模式, 多反应监测模式(MRM), 毛细管电压 2.5 kV, 脱溶剂气温度 350 $^{\circ}$ C, 脱溶剂气流量 800 L/h, 锥孔气流量 50 L/h. 质谱 MRM 采集条件见表 1.

Table 1 MRM parameters for eight neurochemicals*

Analyte	Cone voltage/V	Quantitation transition, m/z (Collision/eV)	Confirmation transition, m/z (Collision/eV)	t_R /min
Glutamic acid(Glu)	20	148.10>84.05(16)	148.03>102.01(10)	6.27
Aspartic acid(Asp)	22	134.01>73.92(14)	134.08>87.97(10)	6.07
γ -Aminobutyric acid(GABA)	20	104.04>87.05(10)	104.02>68.97(14)	5.70
Serine(Ser)	19	106.07>60.07(10)	105.99>87.94(14)	5.78
Taurine(Tau)	26	126.04>44.02(14)	126.03>108.08(10)	6.09
Acetylcholine(Ach)	18	146.01>87.03(14)	146.01>43.06(22)	9.99
Dopamine(DA)	18	154.18>136.97(10)	154.18>90.96(20)	10.49
5-Hydroxytryptamine (5-HT)	15	177.02>160.00(12)	177.02>132.00(20)	14.89

* Collision energies(eV) are given in brackets.

1.4 样品分析

1.4.1 标准溶液的配制 分别精密称取 8 种待测物并以超纯水溶解, 配制成 1.0 mmol/L 的单标储备液. 用 0.12% 甲酸/aCSF(体积比 9:1) 稀释至 100 μ mol/L 的混合标准溶液, 再逐级稀释配制成不同浓度的标准工作液.

1.4.2 方法学考察 标准曲线及定量限: 按照上述方法配制系列混合标准溶液, 采用外标法定量. 以待测物浓度作为横坐标, 定量离子对峰面积为纵坐标, 得到 8 种待测物的线性回归方程, 以 10 倍信噪比(S/N) 为标准确定方法的定量限(LOQ) .

精密度、加标回收率及基质效应: 在人工脑脊液中添加高、中、低 3 个浓度水平的标准溶液, 每个浓度平行测定 6 次, 分别在 3 日内测试, 测得日内、日间精密度和加标回收率. 添加浓度分别为 0.5, 1.25 和 5.0 μ mol/L Glu, 0.25, 0.75 和 2.5 μ mol/L Asp, 0.25, 0.75 和 1.5 μ mol/L GABA; 0.75, 2.5 和 10 μ mol/L Tau; 0.75, 2.5 和 10 μ mol/L Ser; 0.5, 2.0 和 7.5 nmol/L Ach; 0.5, 2.0 和 7.5 nmol/L DA 以及 0.5, 1.5 和 5.0 nmol/L 5-HT. 以流动相 A 配制 8 种分析物高、中、低 3 个浓度水平的溶剂标样, 用脑透析液配制相同浓度水平的基质标样考察基质效应(ME) [ME(%)= (基质标样峰面积-脑透析液中待测物峰面积) /溶剂中标样峰面积 \times 100%].

2 结果与讨论

2.1 五味子水提取物对糖尿病脑病大鼠记忆能力的影响

定位航行实验用于考察大鼠的空间学习能力, ELT 越短说明学习能力越强; 而空间探索实验考察大鼠的空间记忆能力, 原平台所在象限路程/总路程[中心区域(%)]越大、穿越目标次数越多说明动物的记忆能力越强. 由表 2 可见, 模型组大鼠的逃避潜伏期显著高于空白组($P<0.01$), 穿越目标区域的次数及中心区域(%) 显著低于空白组($P<0.05$), 说明实验期间糖尿病动物已经发生了记忆能力下降的脑病病变. 经五味子给药治疗 70 d 后, 五味子组可以显著降低模型大鼠逃避潜伏期($P<0.01$), 提高中心区域(%) 及穿越目标区域的次数($P<0.01$), 表明五味子具有治疗糖尿病性脑病的作用, 从而改善模型动物的记忆能力.

Table 2 Effects of schisandra aqueous extract on learning and memory abilities of diabetic encephalopathy rats[#]

Group	Dose/(g \cdot kg ⁻¹)	ELT/s	Central zone(%)	Times of crossing target zone
Control group	—	51.90 \pm 34.62**	21.87 \pm 6.25*	2.43 \pm 0.78*
Model group	—	103.50 \pm 33.06	15.23 \pm 5.34	1.05 \pm 0.57
Schisandra group	2	51.53 \pm 47.80**	24.70 \pm 5.97**	3.50 \pm 0.84**

[#] Data vs. model group; * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

2.2 五味子水提取物对糖尿病脑病大鼠海马区神经活性物质含量的影响

采用自制的耐高压在线进样器实现了清醒动物在线微透析-高效液相色谱-质谱联用分析,其样品无需前处理即可进行检测,同时动物可在清醒状态下进行内源性神经递质含量的测定,结果更加真实可靠.在优化在线微透析技术采样条件的过程中,灌流液、灌流速度以及采样间隔是主要的考察因素.人工脑脊液在脑部微透析研究中应用最广泛,且符合本研究中神经活性物质极性较强、水溶性好的特点.各待测物在 1.0 及 2.0 $\mu\text{L}/\text{min}$ 的灌流速度下均具有良好的探针回收率,而在线检测系统中进样体积取决于灌流速度及采样间隔两方面因素,为满足色谱分析要求、避免样品量过载,实验选择灌流速度为 1.0 $\mu\text{L}/\text{min}$,间隔 20 min,进样体积为 20 μL 的在线采样检测系统.

此外,保证检测的灵敏度对于监测神经化学物质的体内含量的准确性非常重要.我们^[21]已经建立了无需衍生化、采用液相色谱-质谱联用技术直接对干血斑中 9 种氨基酸的定量分析方法.在本研究中,除了检测脑脊液中的几种氨基酸含量,还同时检测了 3 种神经递质的含量,采用 MRM 模式测定了待测物的含量.为了保证检测的灵敏度,根据待测物的保留时间不同将它们分为 2 组,分别在质谱的不同通道中检测,每组化合物在各自的运行期间同时监测.此外,人工脑脊液中所含无机盐会对质谱离子源造成污染,故前 3.5 min 的液相流出液切换至废液中,不进行质谱检测.

2.2.1 标准曲线的测定 图 1 为正常大鼠大脑海马区 8 种神经活性物质的微透析-液质联用在线检测的提取离子流图.8 种待测物的标准曲线、线性范围、相关系数(R^2)及定量限的测定结果列于表 3.

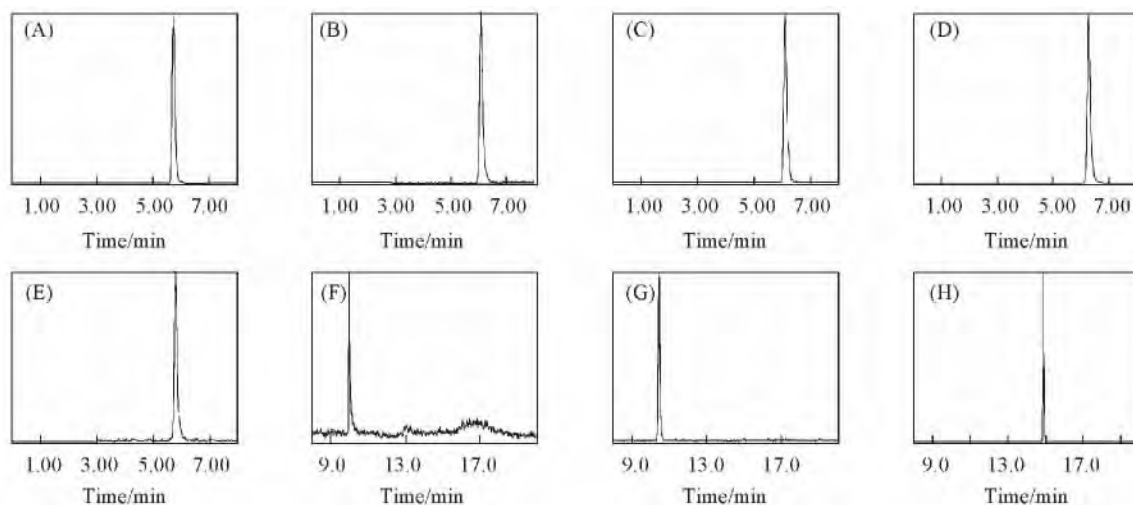


Fig.1 Extracted ion chromatograms of eight analytes in control rat hippocampus

(A) GABA; (B) ASP; (C) Tau; (D) Glu; (E) Ser; (F) Ach; (G) DA; (H) 5-HT.

Table 3 Results of eight analytes measured by online MD-HPLC-MS/MS method

Analyte	t_R/min	Dynamic range/ $(\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$	Regression equation	Correlation coefficient(R^2)	LOQ/ $(\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1})$
Glu	6.28	0.25—10.0	$y = 13.2x + 3025.2$	0.999	50
Asp	6.10	0.1—5.0	$y = 16.1x + 1886.3$	0.999	80
GABA	5.72	0.1—2.5	$y = 4.56x + 235.3$	0.997	48
Tau	6.09	0.5—10.0	$y = 0.81x + 323.7$	0.998	250
Ser	5.79	0.5—10.0	$y = 7.34x + 2247.2$	0.999	75
Ach	9.99	2×10^{-4} — 10×10^{-2}	$y = 775.0x + 1102.2$	0.995	0.02
DA	10.50	5×10^{-4} — 10×10^{-2}	$y = 354.7x - 0.4$	0.997	0.025
5-HT	14.89	5×10^{-4} — 10×10^{-2}	$y = 296.5x - 7.1$	0.999	0.075

2.2.2 方法学考察 8 种待测物各浓度水平的日间精密度、日内精密度、加标回收率以及基质效应的测定结果列于表 4.可见,各待测物 QC 样品测试结果均符合生物样品测定有关要求.脑透析液基质对 8 种物质的基质效应(ME)在 91.90%~107.42%之间,表明基质对待测物无干扰.

2.2.3 不同组别大鼠脑内 8 种神经活性物质水平的比较 不同组别大鼠脑内 8 种神经活性物质水平的比较结果如图 2 所示.

Table 4 Precisions and recoveries of the eight analytes($\mu\text{mol/L}$)

Analyte	Added concentration / ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	Precision(%)		Recovery(%)	Analyte	Added concentration / ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	Precision(%)		Recovery(%)
		Intra-day	Inter-day				Intra-day	Inter-day	
Glu	0.5	8.21	1.95	95.27	Ser	0.75	6.48	5.75	102.54
	1.25	8.54	2.34	96.38		2.5	5.24	5.18	99.36
	5	10.90	1.87	104.32		10	6.39	4.97	92.56
Asp	0.25	8.34	4.68	98.25	Ach	5×10^{-4}	9.68	8.69	108.41
	0.75	10.72	3.25	90.88		2×10^{-3}	11.37	9.28	94.31
	2.5	6.59	3.48	110.79		7.5×10^{-3}	10.24	9.04	98.37
GABA	0.25	8.34	11.67	89.80	DA	5×10^{-4}	8.61	4.64	105.37
	0.75	11.98	9.67	98.06		2×10^{-3}	9.54	6.28	90.87
	1.5	10.02	9.21	93.24		7.5×10^{-3}	9.06	6.33	103.28
Tau	0.75	8.88	3.26	109.26	5-HT	5×10^{-4}	9.28	12.43	106.04
	2.5	7.69	4.14	106.38		1.5×10^{-3}	9.58	10.25	92.47
	10	6.32	4.87	106.85		5×10^{-3}	7.24	9.94	102.19

牛磺酸(Tau) 是一种抑制性神经调质, 具有神经保护作用, 包括抗兴奋性氨基酸神经毒性、调节渗透压、维持细胞膜结构完整和细胞内 Ca^{2+} 动态平衡、抗氧化和抗炎反应等作用. 研究^[22]表明, 牛磺酸可降低中性粒细胞的浸润, 改善局灶性脑缺血损伤后的能量代谢, 减轻局灶性脑缺血引起的过氧化损伤. 对肥胖并持续糖尿病大鼠在饮食中补充 2% 牛磺酸, 能够降低血糖、甘油三酯及胆固醇水平, 改善胰岛素抵抗, 牛磺酸缺乏会导致糖尿病症状加剧并进一步促进并发症的发生^[23].

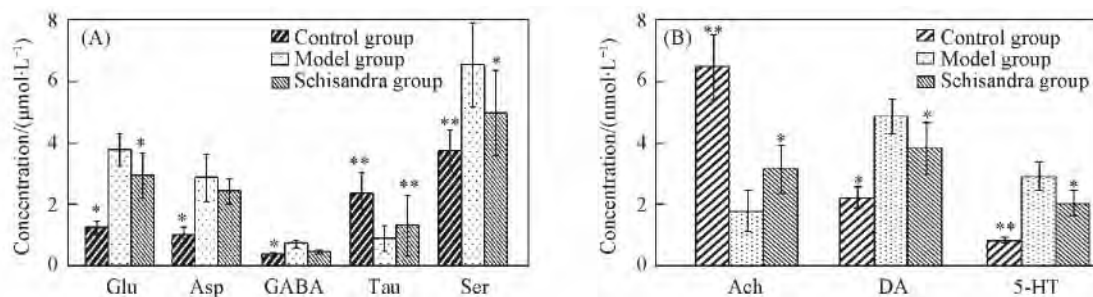


Fig.2 Comparison on the contents of 8 kinds of neurochemicals in the cerebral dialysate of different group rats

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

乙酰胆碱(Ach) 存在于胆碱能神经元泡囊中, 是迄今发现与学习记忆关系最为密切的一种神经递质. 研究^[24]表明, 在血管性痴呆的发病进程中, 随着乙酰胆碱酯酶活性的增强, 海马区及下丘脑中单胺类神经递质(5-HT, DA 和 NA 等) 的含量显著下降. 通过对阿尔茨海默病患者脑内 Ach 测定发现, 海马和皮质胆碱活性降低与内隐、外显记忆缺失相关^[25].

谷氨酸(Glu) 和天门冬氨酸(Asp) 是中枢神经系统的兴奋性神经递质, 尤其谷氨酸是中枢神经系统含量最高、分布最广且作用最强的兴奋性神经递质. 正常情况下兴奋性氨基酸主要存在于神经末梢的突触囊泡内, 末梢去极化时释放到突触间隙, 作用于突触后膜的特异性受体, 从而完成兴奋性突触传递及其它生理作用. 而过量的兴奋性氨基酸对神经系统具有神经毒性作用.

γ -氨基丁酸(GABA) 是海马区中最主要的抑制性神经递质. GABA 能突触具有类似兴奋性谷氨酸能突触的作用, 阻断 GABA 能抑制可以显著提高神经元的兴奋性^[26]. GABA 具有激发血糖升高同时降低血清胰岛素水平的作用^[27].

丝氨酸(Ser) 可促进脂肪和脂肪酸的新陈代谢, 有助于维持免疫系统. 丝氨酸主要参与突触可塑性调节、信息传递以及神经兴奋性毒性等生理病理过程^[28]. 脑组织中 L-丝氨酸是合成神经递质 D-丝氨酸和甘氨酸的前体, 是甘氨酸受体内源性配体之一. 而甘氨酸受体的激活可引起神经元膜超极化, 阻断 NMDA(*N*-methyl-D-aspartate) 受体的通道开放, 从而抑制谷氨酸对神经元的兴奋性毒性^[29]. 模型动物海马区透析液中丝氨酸含量的增多可能导致甘氨酸受体减少, 从而影响甘氨酸发挥抑制谷氨酸的神经元兴奋性毒性.

5-羟色胺(5-HT)是一种抑制性神经递质,在大脑皮层质及神经突触内含量很高.海马区也有5-HT能神经元存在,通过5-HT的受体中介调控靶细胞的兴奋或抑制,进而调节学习记忆功能^[30,31].

多巴胺(DA)是主要的单胺类神经递质,研究^[32]表明STZ建立糖尿病大鼠模型6周后模型组大鼠脑内DA水平较正常大鼠显著升高,5-HT水平显著降低.初步推测DA可通过调节精神活动、情绪、识别、思维和推理过程间接影响记忆能力. Luine等^[33]的报道也证明了多巴胺能系统对老年大鼠的学习记忆能力非常重要.

3 结 论

对糖尿病脑病大鼠脑透析液中8种神经活性物质的含量测定结果表明,模型组动物大脑海马区透析液中Glu, Asp, GABA, Ser, DA和5-HT的含量显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$), Tau及ACh的含量显著降低($P<0.01$),表明兴奋性氨基酸、抑制性氨基酸及相关神经递质均参与了糖尿病脑病的发病.行为学实验结果表明,经五味子治疗后,疾病动物的逃避潜伏期明显缩短,穿越目标区域次数及中心区域(%)显著增加;糖尿病脑病大鼠脑透析液中的Glu, Ser, DA和5-HT的含量显著降低($P<0.05$), Tau及ACh的含量显著升高($P<0.01$), Asp和GABA的含量有降低趋势($P>0.05$),这8种神经活性物质的水平均向正常水平发生了调节.说明五味子可能通过调节糖尿病脑病大鼠脑中神经活性物质的含量发挥保护中枢神经系统的作用,从而改善糖尿病脑病大鼠的学习记忆能力.

参 考 文 献

- [1] Editorial Committee of Pharmacopoeia of People's Republic of China, *Pharmacopoeia of People's Republic of China*, Beijing, 2010, 61—62(中华人民共和国药典委员会, 中华人民共和国药典, 北京, 2010, 61—62)
- [2] Lu H., Liu G. T., *Planta Med.*, **1992**, 58, 311—313
- [3] Hu Y. W., *Food and Drug*, **2008**, 10(11), 53—54(胡彦武. 食品与药品, 2008, 10(11), 53—54)
- [4] Huyke C., Engel K., Simon-Haarhaus B., Quirin K. W., Schempp C. M., *Planta Med.*, **2007**, 73, 1116—1126
- [5] Wang Y. C., Ren K., Fan H. Y., Shen N., Huang X. D., Chang Y., Xu N., Liu S. B., Liu W., Lei J. T., An Y., Chen X., *Chin. J. Chin. Mater. Med.*, **2011**, 36(23), 3310—3314(王艳春, 任旷, 范红艳, 沈楠, 黄晓东, 常影, 许娜, 刘师兵, 刘微, 雷钧涛, 安英, 陈雪. 中国中药杂志, 2011, 36(23), 3310—3314)
- [6] Yu F., Tuo X. P., Lü J. Y., Chen H. S., *Acad. J. Sec. Mil. Med. Univ.*, **2007**, 28(12), 1351—1355(于方, 拓西平, 吕建勇, 陈海生. 第二军医大学学报, 2007, 28(12), 1351—1355)
- [7] Gao W. R., Jin X. Z., Li X. D., *Lishizhen Med. Mater. Med. Res.*, **2010**, 21(10), 2705—2706(高文荣, 金香子, 李香丹. 时珍国医国药, 2010, 21(10), 2705—2706)
- [8] Wang Y. C., Ren K., Fan H. Y., Shen N., Huang X. D., Xu N., Liu S. B., Liu W., Lei J. T., An Y., Chen X., Chang Y., *Chin. Pharm. J.*, **2011**, 46(11), 1097—1103(王艳春, 任旷, 范红艳, 沈楠, 黄晓东, 许娜, 刘师兵, 刘微, 雷钧涛, 安英, 陈雪, 常影. 中国药理学杂志, 2011, 46(11), 1097—1103)
- [9] Zhang J. F., *Coupling on-line Microdialysis Sampling with the Electrogenenerated Chemiluminescence Sensor for Studying Drug Protein Interactions*, Shanxi Normal University, Xi'an, **2012**(张建锋. 在线微透析电化学发光传感器研究药物蛋白相互作用, 西安: 陕西师范大学, 2012)
- [10] Chang L. W., Xu G. Y., Han H. W., Chang X. Y., Zhao Z., *Chem. J. Chinese Universities*, **2002**, 23(4), 552—554(常理文, 徐桂芸, 韩慧婉, 常溪燕, 赵卓. 高等学校化学学报, 2002, 23(4), 552—554)
- [11] Zheng H., Shi L. F., Hu J. H., *Biomed. Chromatogr.*, **2007**, 21(1), 101—106
- [12] Tzschentke T. M., Folgering J. H. A., Flik G., de Vry J., *Neurosci. Lett.*, **2012**, 507(2), 151—155
- [13] Pan L. Y., Wang C. J., Yuan J. B., Zhang Y., Huang L. J., Wang Z. F., *Chem. J. Chinese Universities*, **2014**, 35(2), 237—243(潘丽英, 王承健, 袁江北, 张英, 黄琳娟, 王仲孚. 高等学校化学学报, 2014, 35(2), 237—243)
- [14] Ma Q. S., Wang Q., Zhao K. S., Zhai S. B., Liu S., Liu Z. Q., *Chem. J. Chinese Universities*, **2013**, 34(12), 2716—2720(马青山, 王茜, 赵凯妹, 翟淑波, 刘舒, 刘志强. 高等学校化学学报, 2013, 34(12), 2716—2720)
- [15] Xue C. F., Guo J. M., Qian D. W., Duan J. A., Shang E. X., Shu Y., Lu Y. W., *J. Chromatogr. B*, **2011**, 879, 317—325
- [16] Wang C., Li S., Tang Y. J., Wang S. W., Zhang Y. L., Fan G. R., Li L. Q., Zhang Y., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2012**, 64/65, 1—7
- [17] Liu L., Huang J. Q., Li K. X., Hu X., Sun C. H., *J. Chromatogr. B*, **2011**, 879, 56—60
- [18] Wang Q. Q., Zhang J., Pi Z. F., Liu S., Song F. R., Liu Z. Q., *Chin. J. Anal. Chem.*, **2014**, 42(7), 997—1001(王倩倩, 张静, 皮

- 子凤, 刘舒, 宋凤瑞, 刘志强. 分析化学, **2014**, 42(7) , 997—1001)
- [19] Das J. , Roy A. , Sil P. C. , *Food Funct.* , **2012** , 3(12) , 1251—1264)
- [20] Chen W. Z. , Wang K. Y. , Hong Z. , Lü C. Z. , *Chinese J. Neuroanat.* , **2008** , 24(4) , 425—428(陈文珍, 王开颜, 洪震, 吕传真. 神经解剖学杂志, **2008** , 24(4) , 425—428)
- [21] Wang C. Y. , Zhang W. Y. , Song F. R. , Liu Z. Q. , Liu S. Y. , *Amino Acids* , **2012** , 42 , 1889—1895
- [22] Sun M. , Zhao Y. M. , Xu C. , *J. Apopl. Nervo. Dis.* , **2008** , 25(5) , 577—579(孙明, 赵育梅, 徐超. 中风与神经疾病杂志, **2008** , 25(5) , 577—579
- [23] Kim K. S. , Oh D. H. , Kim J. Y. , Lee B. G. , You J. S. , Chang K. J. , Chung H. , Yoo M. C. , Yang H. I. , Kang J. H. , Hwang Y. C. , Ahn K. J. , Chung H. Y. , Jeong I. K. , *Exp. Mol. Med.* , **2012** , 44(11) , 665—673
- [24] O' Brein M. D. , *Dementia* , **1994** , 5 , 133—136
- [25] Perry E. , Walker M. , Grace J. , Perry R. , *Trend Neurosci.* , **1999** , 22(6) , 273—280
- [26] Wigstrom H. , Gustafsson B. , *Nature* , **1983** , 301 , 603—604
- [27] Wang Z. , Zhang L. , *Chin. J. Diabete* , **1999** , 7(4) , 219—221(王真, 张路. 中国糖尿病杂志, **1999** , 7(4) , 219—221)
- [28] He W. J. , Ruan H. Z. , *Prog. Physiol. Sci.* , **2009** , 40(4) , 303—307(何文娟, 阮怀珍. 生理科学进展, **2009** , 40(4) , 303—307)
- [29] Ren T. J. , Wang G. H. , Jiang Z. L. , *Chin. J. Pathophys.* , **2012** , 38(3) , 470—477(任桃杰, 王国华, 姜正林. 中国病理生理杂志, **2012** , 38(3) , 470—477)
- [30] Perez-Garcia G. , Meneses A. , *Behav. Brain Res.* , **2009** , 202 , 102—113
- [31] Sarkisyan G. , Hedlund P. B. , *Behav. Brain Res.* , **2009** , 202 , 26—31
- [32] Geng L. , Liu D. S. , Hao Y. Y. , Guo R. C. , Wang X. L. , Zhang W. D. , *J. Shandong Univ.(Health Sciences)* , **2008** , 46(7) , 689—692 (耿磊, 刘德山, 郝媛媛, 郭瑞臣, 王新陆, 张维东. 山东大学学报(医学版) , **2008** , 46(7) , 689—692)
- [33] Luine V. , Bowling D. , Hearn M. , *Brain Res.* , **1990** , 537 , 271—278

Effect of Schisandra Fruit on Neurochemicals in Hippocampus of Diabetic Encephalopathy Rat Using Online MD-HPLC-MS/MS[†]

PI Zifeng¹ , WANG Qianqian¹ , ZHANG Jing² , Song Fengrui¹ , LIU Zhiqiang^{1*}

(1. National Center of Mass Spectrometry , Changchun Institute of Applied Chemistry ,
Chinese Academy of Sciences , Changchun 130022 , China;

2. School of Pharmaceutical Science , Jilin University , Changchun 130021 , China)

Abstract The results of morris water maze test showed that the extract of schisandra fruit could significantly shorten the escape latency time(ELT) and increase the time of crossing target zone and central zone(%) of diabetic encephalopathy rats. In order to investigate the mechanism of schisandra fruit on the improving ability of learning and memory , online MD-HPLC-MS/MS method was applied to explore the effect of schisandra fruit on eight neurochemicals changes in hippocampus of diabetic encephalopathy rats. The results showed that the contents of Glu , Ser , DA and 5-HT decreased significantly($P < 0.05$) , while the contents of Tau and Ach increased significantly($P < 0.01$) after treated by schisandra fruit. The contents of Asp and GABA tended to decrease but the difference was not significant($P > 0.05$) . The levels of eight neurochemicals regulated to normal level. The results indicated that schisandra may play a protective function of the central nervous system by adjusting the contents of neurochemicals in diabetic rats , which can improve the memory and learn ability of diabetic encephalopathy rat.

Keywords Schisandra fruit; Online MD-HPLC-MS/MS; Diabetic encephalopathy rat; Hippocampus; Neurochemical

(Ed.: N, K)

[†] Supported by the National Natural Science Foundation of China(No.81373952) and the Innovation Method Fund of Ministry of Science and Technology , China(No.2012IM030600) .